

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

41-12

リスト = 2288688 と記載して  
しつてある。記載通り

(1)

明細書に231頁から232頁まで

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

228688 25

特開平7-228688

(43) 公開日 平成7年(1995)8月29日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 G 69/10	NRN			
A 6 1 K 47/42		B		
C 0 8 G 69/48	NRH			

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平6-21561  
(22) 出願日 平成6年(1994)2月18日

(71) 出願人 000006677  
山之内製薬株式会社  
東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号  
(72) 発明者 横田 充  
京都府京都市左京区下鴨南茶ノ木町41番地  
の1  
(72) 発明者 ▲高▼倉 喜信  
京都府京都市左京区一乗寺塚本町35番地  
サンライフ北白川306号  
(74) 代理人 弁理士 長井 省三 (外1名)

(54) 【発明の名称】 糖修飾ポリ- $\omega$ -置換-L-グルタミン酸誘導体およびその製造方法

(57) 【要約】

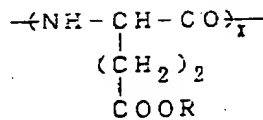
【構成】 ポリ- $\omega$ -置換-L-グルタミン酸の $\omega$ -位の置換基をN-[(1-チオガラクトピラノシル-2-イミノ)-エチル]-エチレンジアミニル基で置換した高分子化合物。

【効果】 この高分子化合物は、肝実質細胞を認識できる作用があり、DDS製剤開発用の担体として応用できる。

【特許請求の範囲】

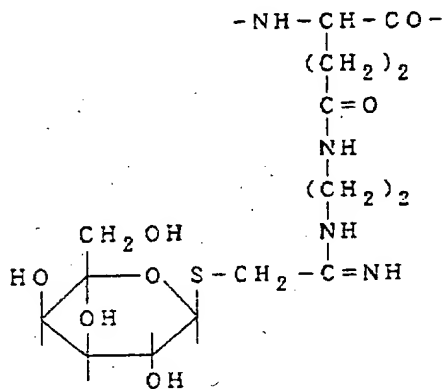
【請求項 1】 一般式

【化 1】



(式中、Xは重合度 20～540であることを、Rは水素原子、低級アルキル基又はベンジル基を各々意味する)で示されるポリ- $\omega$ -アルキル (又はベンジル) - L-グルタミン酸の構成ペプチド結合の一部または全部を、一般式

【化 2】



$\omega$ -アルキル (又はベンジル) - L-グルタミン酸残基 0～10%  
L-グルタミン酸残基 55～95%  
 $\omega$ -N- [(1-チオガラクトピラノシル-2-イミノ) -エチル] -  
エチレンジアミル-L-グルタミン酸残基 5～35%

であり、分子量 8,000～70,000であることを特徴とする請求項 1 記載の誘導体。

【請求項 3】 下記の構成単位の比率が、

$\omega$ -N- [(1-チオガラクトピラノシル-2-イミノ) -エチル] -エチレンジアミル-L-グルタミン酸残基 9±1%

であり、平均分子量 25,000±10,000であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の誘導体。

【請求項 4】 N-(2-アミノエチル) アミジノメチルチオガラクトピラノシドとポリ-L-グルタミン酸を反応させることを特徴とする請求項 1 記載の誘導体の製造方法。

【請求項 5】 2-イミノ-2-メトキシエチル-1-チオガラクトピラノシドとエチレンジアミンを反応させて得られる N-(2-アミノエチル) アミジノメチルチオガラクトピラノシドに、更にポリ-L-グルタミン酸を反応させることを特徴とする請求項 1 記載の誘導体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、医用高分子材料、殊にミサイル医薬担体として有用な糖修飾ポリ-L-グルタミン酸誘導体およびその製造方法に関する。

【0002】

で表される  $\omega$ -N- [(1-チオガラクトピラノシル-2-イミノ) -エチル] -エチレンジアミル-L-グルタミン酸残基で置換したポリ- $\omega$ -アルキル (又はベンジル) -L-グルタミン酸誘導体。

【請求項 2】 各構成単位の比率が、

20

30

40

【従来の技術】 血清中の糖タンパクは、その末端に普遍的にシアル酸-ガラクトース-N-アセチルグルコサミンという糖構造が存在している。1960年代後半に G. Ashwell と A. Morell は、この三糖構造が血清タンパクが血液中に安定に存在するために必要な構造であることをつきとめた。末端に存在するシアル酸を取り除くと、ガラクトースが新しい糖末端となる。シアル酸が除かれてガラクトースが露出した糖タンパクはアシアロ糖タンパクと呼ばれている。アシアロ糖タンパクは、この状態では血流中に安定に存在できなくなり、急速に血流中より消失する。消失したアシアロ糖タンパクのおよそ 80% 以上は肝臓に取り込まれることが判明している。

【0003】 ところで、肝細胞の膜表面上には特異的認識レセプターが存在し、アシアロ糖タンパクはこのアシアロ糖タンパクレセプターを介して細胞内に取り込まれたものである。そこで、このレセプターの性質を利用し、これまでに標的臓器移行性の薬物担体としてポリグ

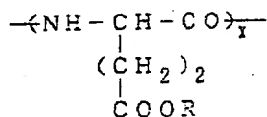
ルタミン酸を糖で修飾する具体的な試みがなされている(特開平5-178986)。さらに、標的臓器に対する認識性を向上させるために、ポリグルタミン酸への糖修飾のスペーサーが検討された(吉川剛兆ら、日本薬学会111年会講演要旨集4、129、1991)。しかしながら、これらは肝臓に対する移行性を向上させることが出来たものの、選択性に関しては不十分であった。発明者らは、ポリグルタミン酸と糖修飾の際のスペーサーを精査した結果、ポリグルタミン酸1分子当りのガラクトース残基数を低下させることが可能となり、しかも肝臓に対してより選択性の高い化合物を発明するに到った。また、ガラクトース修飾ポリグルタミン酸の糖修飾率が増加すると、生分解性が低下することが示唆されていることから(権正ら、DDS技術研究会第38回定例会要旨、1993)、本発明化合物はより安全性の高いことが期待される。

【0004】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、一般式

【0005】

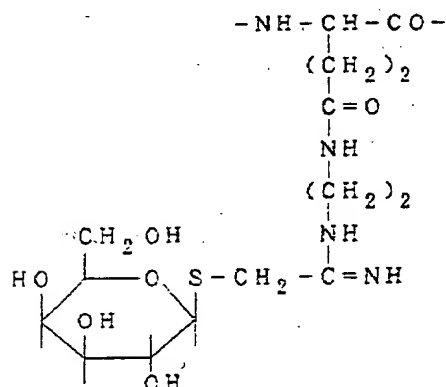
【化3】



【0006】(式中、Xは重合度20~540であることを、Rは水素原子、低級アルキル基又はベンジル基を各々意味する。)で示されるポリペプチドにおいて、その構成ペプチドの一部または全部を

【0007】

【化4】



構成単位の比率:

ω-アルキル(又はベンジル)-L-グルタミン酸残基 0~10%  
L-グルタミン酸残基 55~95%  
ω-N-[(1-チオガラクトピラノシル-2-イミノ)-エチル]-  
-エチレンジアミニル-L-グルタミン酸残基 5~35%

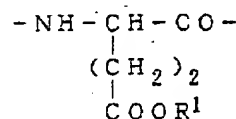
Rの低級アルキル基としては、炭素数が1乃至6個の直鎖又は分岐状の炭素鎖を意味し、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イ

【0008】で表わされるω-N-[(1-チオガラクトピラノシル-2-イミノ)-エチル]-エチレンジアミニル-L-グルタミン酸残基で置換した糖修飾ポリ-ω-アルキル(又はベンジル)-L-グルタミン酸誘導体に関する。本発明のポリペプチドを更に説明すると以下の通りである。

構成単位: ω-アルキル(又はベンジル)-L-グルタミン酸残基

【0009】

10 【化5】



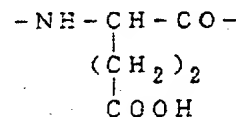
【0010】(式中、R<sup>1</sup>は低級アルキル基又はベンジル基を示す。)

L-グルタミン酸残基

【0011】

【化6】

20

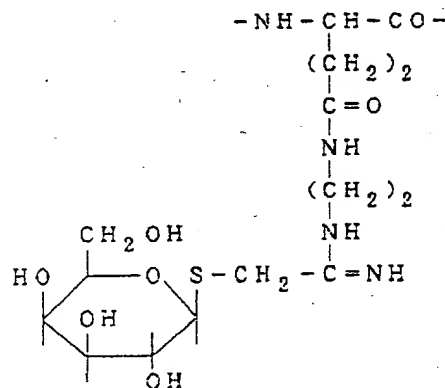


【0012】ω-N-[(1-チオガラクトピラノシル-2-イミノ)-エチル]-エチレンジアミニル-L-グルタミン酸残基

【0013】

【化7】

30



40 【0014】配列状態: 線状

分子量: 8,000~70,000

重合度: 20~540

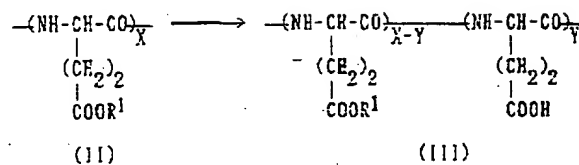
ソブチル基, sec-ブチル基, tert-ブチル基, ペンチル基, イソペンチル基, ネオペンチル基, tert-ペンチル基, ヘキシル基, イソヘキシル基等が挙げ

られる。本発明化合物の製造方法を更に説明すると、たとえば次式で示される方法により合成できる。

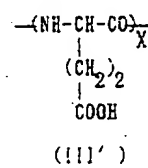
【0015】

【化8】

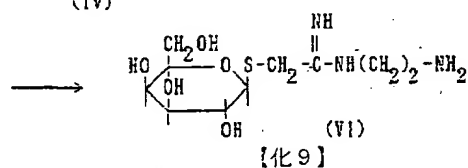
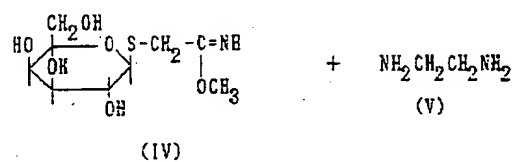
## 第1工程



又は



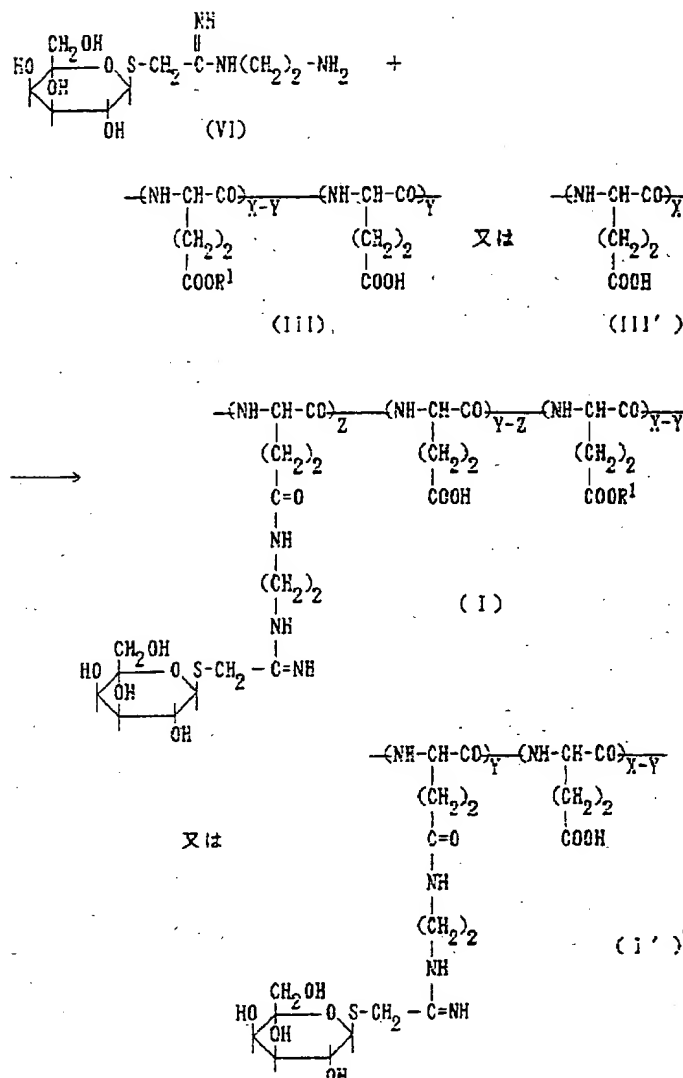
## 第2工程



【0016】

【化9】

## 第 3 工程



【0017】(式中、Xは前記の通りで、R<sup>1</sup>は低級アルキル基又はベンジル基を意味する。また、Y、ZはともにX以下であってY≧Zを満たす整数である。)この方法は、ポリ-ω-アルキル(又はベンジル)-L-グルタミン酸(II)の側鎖アルキルエステル(又はベンジルエステル)を加水分解して側鎖カルボキシル基が遊離した重合体(III)又は(III')を得(第1工程)、次いでこの重合体(III)又は(III')の側鎖カルボキシル基に第2工程により合成したN-(2-アミノエチル)アミノメチルチオガラクトピラノシド(VI)を導入して本発明化合物(I)又は(I')を得る(第3工程)ことにより行う。

【0018】第1工程の加水分解は、ポリ-ω-アルキル(又はベンジル)-L-グルタミン酸を適当な有機溶媒中、塩基で処理することにより容易に行うことができる。有機溶媒としては、たとえばクロロホルム、ジクロルメタン等のハロゲン化炭化水素(ヘリックス溶媒)が

好適であるが、ジクロル酢酸、トリフルオロ酢酸などのランダムコイル溶媒を用いることもできる。

【0019】塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等が適当である。これらの塩基は通常メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール水溶液として反応液中に添加される。反応は、室温附近で、10~200分間行う。これらの反応条件、殊に反応時間を適宜選ぶことにより、加水分解の割合を任意に調節することができる。なお、本工程の原料化合物として使用するポリ-ω-置換-L-グルタミン酸(II)は、重合度がおおよそ20~540のものが用いられるが、これに限定されるものではない。また、原料化合物として、市販のポリ-L-グルタミン酸を使用する場合には、本工程を省略することができる。

【0020】第2工程は、2-イミノ-2-メトキシエチル-1-チオガラクトピラノシド(IV)とエチレンジアミン(V)をホウ酸緩衝液中に1:1のモル比で添加

し、24時間反応させることにより、N-(2-アミノエチル) アミジノメチルチオガラクトピラノシド (VI) を得る工程である。

【0021】第3工程は、N-(2-アミノエチル) アミジノメチルチオガラクトピラノシド (VI) と第1工程で得た部分加水分解物(III) 又は、ポリ-L-グルタミン酸(III') とを縮合剤を用いてカップリングさせる工程である。縮合剤としては、たとえばN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドハイドロクロライド (EDC) 等が挙げられる。生成した目的化合物 (I) 又は (I') は、たとえばセルロース透析膜を用いる透析により精製することができる。なお、本発明化合物に薬物等を結合させる場合には、式 (I) 又は (I') 中のグルタミン酸残基のカルボキシル基に化学的又は物理的 (例えばアミド結合、エステル結合、イオン結合等) に結合させることができる。

【0022】(物質の特性) 本発明化合物 (I) 又は (I') の分子量の測定は、各種の方法により可能であるが、例えば標準物質としてOvalbumin (分子量43,000)、BSA (Bovine Serum Albumin) (分子量67,000) を用いたゲルパーミエーションクロマトグラフィー法 (HPLC) (カラム: 島津製作所 (株) Shim-pack Diol-300, 溶出液: 等張リン酸緩衝液 (pH7.4), 溶出速度: 1ml/min) によって分子量を求めることができる。

#### 【0023】

【発明の効果】本発明化合物は、後記実験例に示すように、標的臓器に対する移行性が確認されたことから、生体認識高分子として医療分野に応用することができる。本発明化合物は天然類似高分子であるポリアミノ酸であるから、生分解性であり、スパーサーを介してガラクトース残基を修飾していることから、低修飾率にて標的臓器への移行性が達成される。また、糖修飾率の低いポリアミノ酸ほど生分解性が高いことは既に明らかになっており、本発明化合物は安全性の高い化合物であることが期待される。したがって、本発明化合物は、ミサイルドラッグ等に用いる医薬担体用高分子として好適である。

#### 【0024】

【実施例】つぎに、実施例を挙げて本発明化合物およびその製造方法を更に説明する。ここでPLGAはポリ-L-グルタミン酸を、Gal-PLGAはガラクトース修飾ポリ-L-グルタミン酸を各々意味する。

#### 実施例1

(1) 2-イミノ-2-メトキシエチル-1-チオグリコシド-β-D-ガラクトピラノシド (EYラボラトリーズ) 200mg とエチレンジアミン (和光純薬) 50μl を5ml のホウ酸緩衝液 (pH9.5, 50mM) に約1:1のモル比となるように添加し、24時間反応

させた。1NのHClにてpH5に調整し、2-イミノ-2-メトキシエチル-1-チオグリコシド-β-D-ガラクトピラノシド100mgに対し、ポリ-L-グルタミン酸 (Sigma) (分子量15,000~50,000) 60mg、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド ハイドロクロライド (和光純薬) 60mg 添加後、1晩攪拌した。蒸留水に対し透析後凍結乾燥した。

【0025】(2) 2-イミノ-2-メトキシエチル-1-チオグリコシド-β-D-ガラクトピラノシド (EYラボラトリーズ) 20mg と (1) で得たGal-PLGA 20mg を5ml のホウ酸緩衝液 (pH9.5, 50mM) に約50:1のモル比となるように添加し、24時間反応させ、蒸留水に対し透析後、凍結乾燥した。

分子量 (HPLC) 25,600

#### 【0026】(3) 糖導入率測定

72%硫酸1ml当りアントロン (Sigma) 0.5mg を溶解させ、試液とした。(1), (2) で合成したGal-PLGA水溶液0.6mlと試液3mlを十分攪拌し、100℃にて12分間加熱した。室温まで温度を下げた後、628nmの吸光度を測定した。

結果 (1) 3.7モル ガラクトース/モル PLGA (ガラクトース修飾残基率 1.9%)

(2) 18.2モル ガラクトース/モル PLGA (ガラクトース修飾残基率 9.1%)

#### 【0027】実験例

糖修飾率の異なるガラクトース修飾ポリ-L-グルタミン酸誘導体 (Gal-PLGA)、また、ビタミンK<sub>2</sub> をモデル薬物として修飾した本発明化合物および比較物質を用い、各高分子のマウスの肝臓への移行性を検討した。

#### 1. 試料

実施例1の(1), (2) で合成したガラクトース修飾残基約2%および9%のGal-PLGAを検体試料とし、糖含量の違いによる肝臓移行性の差を検討した。また、薬物で修飾した場合の移行性を検討するために、ビタミンK<sub>2</sub> で修飾したガラクトース修飾残基約9%のGal-VK<sub>2</sub>-PLGAを試料として用いた。また、比較物質として無修飾のPLGAおよびVK<sub>2</sub>-PLGAを用いた。

#### 2. ビタミンK<sub>2</sub> 修飾体の合成

ビタミンK<sub>2</sub> のPLGA及びGal-PLGA修飾体はビタミンK<sub>2</sub> のアミノ基部分とPLGA又はGal-PLGAのグルタミン酸残基のカルボキシル基部分で常法のアミド結合させることにより得ることができる。

【0028】pH5に調整した蒸留水にビタミンK<sub>2</sub> (ナカライテスク) 15mg, Gal-PLGA 25mgもしくは比較物質としてポリ-L-グルタミン酸 (PLGA) 100mg、1-エチル-3-(3-ジメ

チルアミノプロビル) -カルボジイミド ハイドロクロ  
ライド25mgもしくは100mg添加後、1晩撹拌し  
た。蒸留水にて透析後、凍結乾燥した。ビタミンK<sub>2</sub>の  
修飾率は、300nmの吸光度を測定することにより算

出した。これらの試料の物理化学的特性を表1に示す。

【0029】

【表1】

ポリグルタミン酸およびポリグルタミン酸誘導体の物理化学的特性

高分子	分子量	ガラクトース 残基数 (mol/mol PLGA)	ガラク トース 含量(%)	ビタミンK <sub>2</sub> 含量 (mol/mol PLGA)
PLGA	25200	—	—	—
VK <sub>2</sub> -PLGA	N.D.	—	—	11.2
Gal-PLGA	25600	19.2	11.5	—
Gal-VK <sub>2</sub> -PLGA	N.D.	19.2	11.5	11.7

分子量はHPLCにて測定

N.D. : Not determined

### 【0030】3. 体内動態実験

実験に先立ち検体の<sup>111</sup>In標識化を行った。検体とする高分子をDTPAアンヒドライド(ジエチレントリアミン-N, N, N', N'', N''-五酢酸無水物)と結合後、<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub>を1M酢酸ナトリウム中でキレートさせ、ゲル濾過により、<sup>111</sup>In標識体を得た。これを生理食塩水にて投与液に調製した。ddY系雄性マウス(5週令)に<sup>111</sup>Inで標識した被験高分子1mg/kgを尾静脈より投与し、経時的に肝臓および血液を採取し、肝臓はそのまま秤量し、血液は約3000rpmで2分間遠心分離して血漿とし、その放射活性を測定した(Awell-type NaI Scintillation Counter, ARC-500, Aloka Co., Tokyo, Japan)。その結果を図に示した。

### 【0031】4. 実験結果および考察

PLGAに対して、ガラクトースおよびモデル薬物としてビタミンK<sub>2</sub>を修飾した結果を表1に示した。PLGAへのガラクトース修飾はスペーサーであるエチレンジアミンを介し、PLGA 1分子当り約18分子結合できた。この値はPLGA重量当り約12%、グルタミン酸残基数当り約9%となる。ガラクトース修飾前後の分子量は、それぞれ25, 200, 25, 600であり、ほとんど変化がなかった。ビタミンK<sub>2</sub>のPLGAおよびGal-PLGAに対する修飾率は、どちらも同程度の修飾率であった。

【0032】<sup>111</sup>In標識した高分子を尾静脈投与後の血漿中濃度、肝臓移行性の時間推移を図1~5に示した。いずれの高分子も血中から速やかに消失するもの

の、肝臓移行性は各高分子によって異なり、ガラクトース修飾残基9%のGal-PLGAおよびGal-VK<sub>2</sub>-PLGAは投与後5分以内に60%以上が肝臓に移行した。(図4、5)。ガラクトース修飾していない高分子およびガラクトース修飾残基約2%のGal-PLGAは非常に低い肝臓移行性であった(図1、2、3)。これらのことから、ガラクトース修飾率を高めることにより肝臓への移行性が向上することが明らかとなった。さらに、ビタミンK<sub>2</sub>も肝臓へ送達可能であることが確認された。

【0033】<sup>111</sup>In標識した高分子を尾静脈投与後のクリアランスを表2、図5に示した。肝臓クリアランスと腎臓クリアランス+尿中クリアランスの比において、ガラクトース修飾していない高分子は1以下の低い値を示し、肝臓への選択性はなかった。しかし、ガラクトース修飾残基約9%のGal-PLGAおよびGal-VK<sub>2</sub>-PLGAの肝臓クリアランスと腎臓クリアランス+尿クリアランスの比は7~10の高い値を示したことから、肝臓に対する選択性が非常に向上することが明らかとなった。

【0034】以上より、エチレンジアミンをスペーサーとしてPLGAにガラクトースを修飾することにより、肝臓への移行性が高まると同時に、肝臓への選択性も向上することが明らかとなった。また、この機能はモデル薬物であるビタミンK<sub>2</sub>を修飾しても同様であったことから、Gal-PLGAは肝臓標的性の担体として有用であることが確認された。

【0035】

【表2】



<sup>111</sup>I-ラベルPLGA誘導体のマウス尾静注後の

## AUCおよびクリアランス

高分子	投与量 (mg/kg)	AUC (投与量× hr/ml)	クリアランス (ml/hr)			
			CL (total)	CL (liver)	CL (other)	CL (urine)
PLGA	1	4.83	20.7	2.3	15.9	1.5
Gal-PLGA	1	1.63	61.3	37.6	20.4	3.3
VK <sub>5</sub> -PLGA	1	3.92	25.5	0.4	17.4	7.7
Gal-VK <sub>5</sub> -PLGA	1	2.79	35.8	28.3	5.4	2.1

## 【図面の簡単な説明】

【図1】<sup>111</sup>I-ラベルPLGAのマウス尾静注後の血漿1mlにおける投与量に対する血漿中濃度の割合、および投与量に対する肝臓蓄積量の割合を、時間の推移とともに示すグラフである。

【図2】ビタミンK<sub>5</sub>で修飾された<sup>111</sup>I-ラベルVK<sub>5</sub>-PLGAのマウス尾静注後の血漿1mlにおける投与量に対する血漿中濃度の割合および投与量に対する肝臓蓄積量の割合を時間の推移とともに示すグラフである。

【図3】ガラクトース修飾残基約2%の<sup>111</sup>I-ラベルGal-PLGAのマウス尾静注後の、血漿1mlにおける、投与量に対する血漿中濃度の割合、および投与量に対する肝臓蓄積量の割合を時間の推移とともに示すグラフである。

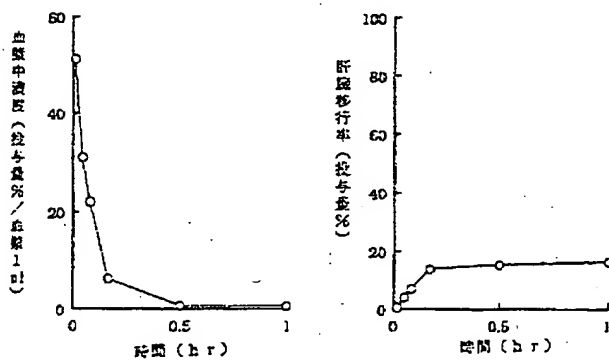
【図4】ガラクトース修飾残基約9%の<sup>111</sup>I-ラベルGal-

PLGAのマウス尾静注後の、血漿1mlにおける、投与量に対する血漿中濃度の割合、および投与量に対する肝臓蓄積量の割合を時間の推移とともに示すグラフである。

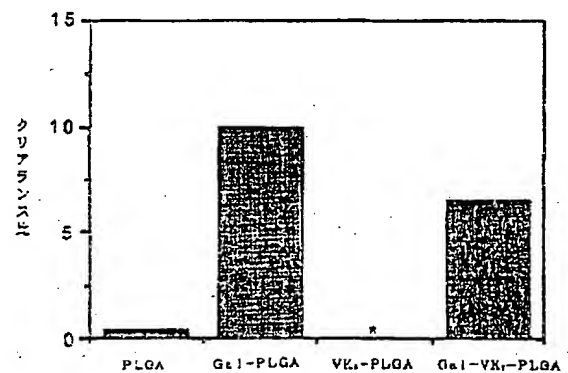
【図5】ガラクトース修飾残基約9%の<sup>111</sup>I-ラベルGal-PLGAに更にビタミンK<sub>5</sub>で修飾した<sup>111</sup>I-ラベルGal-VK<sub>5</sub>-PLGAのマウス尾静注後の、血漿1mlにおける、投与量に対する血漿中濃度の割合、および投与量に対する肝臓蓄積量の割合を、時間の推移とともに示すグラフである。

【図6】PLGA、ガラクトース修飾残基約9%Gal-PLGA、VK<sub>5</sub>-PLGA、ガラクトース修飾残基約9%Gal-VK<sub>5</sub>-PLGAそれぞれについて、クリアランス比(=肝クリアランス/(腎クリアランス+尿クリアランス))を求め、比較したグラフである。

【図1】

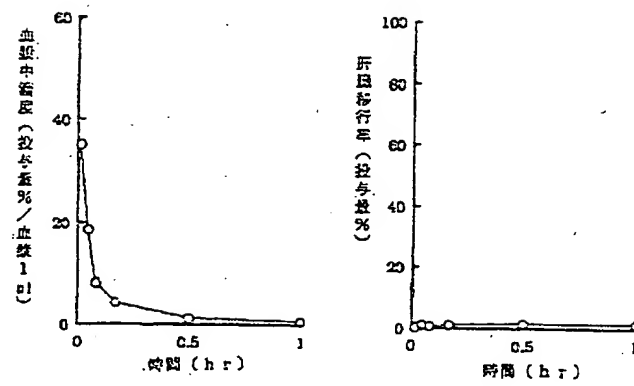


【図6】

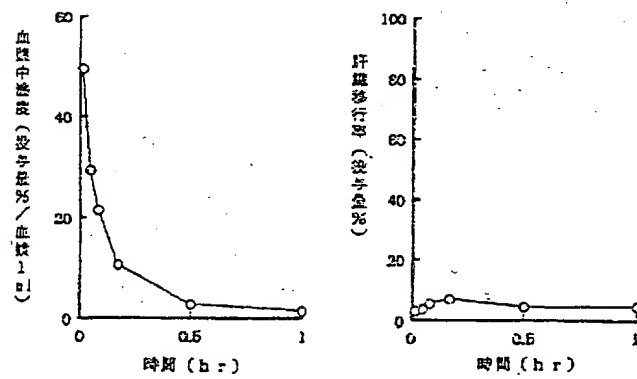


\*; Negligible

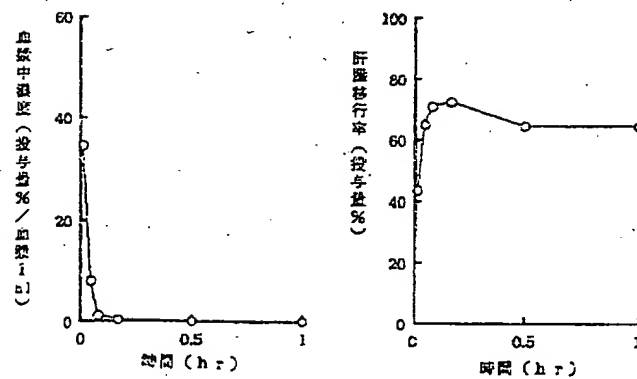
【圖2】



【圖3】



【圖4】



【図5】

